

学校编码：10384  
学号：200326099

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

\_\_\_\_\_硕士\_\_\_\_\_学 位 论 文

# HIV-1 中和表位肽和抗病毒蓝藻蛋白-N 的表达及其生物活性的初步研究

HIV-1 epitope peptide and Cyanovirin-N Express and bioactivity of  
Cyanovirin-N primary study

黄小花

指导教师姓名：刘仁海 副教授

章 军 副教授

专 业 名 称：生物化学与分子生物学

论文提交日期：2006 年 4 月 28 日

论文答辩时间：2006 年 6 月 02 日

学位授予日期：

答辩委员会主席：\_\_\_\_\_

评 阅 人：\_\_\_\_\_

2006 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密( ),在 年解密后适用本授权书。

2、不保密( )

(请在以上相应括号内打“ ”)

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

# 目 录

摘 要 .....	1
-----------	---

A b s t r a c t .....	1
-----------------------	---

## 第一部分 抗病毒蓝藻蛋白-N 的表达及生物功能的初步研究

前 言 .....	1
-----------	---

1 抗病毒蓝藻蛋白-N 的研究进展.....	14
------------------------	----

2 本研究目的与意义.....	14
-----------------	----

材 料 和 方 法 .....	15
-----------------	----

1 材料.....	19
-----------	----

2 方法.....	27
-----------	----

结 果 和 分 析 .....	28
-----------------	----

1 含目的基因原核表达载体的构建.....	28
-----------------------	----

2 目的蛋白的诱导表达.....	31
------------------	----

3 重组蛋白的复性(重折叠).....	32
---------------------	----

4 目的蛋白的分离纯化.....	34
------------------	----

5 鼠抗 CV-N 多克隆抗体的制备与鉴定.....	35
----------------------------	----

6 异硫氰酸荧光素标记 CV-N.....	36
-----------------------	----

7 重组 CV-N 生物活性的初步研究.....	39
--------------------------	----

8 CV-N 与淋巴细胞的相互作用.....	41
------------------------	----

讨 论 .....	42
-----------	----

1 提高目的蛋白的表达量的策略.....	42
----------------------	----

2 提高目的蛋白的生物活性的策略.....	43
-----------------------	----

3 重组 CV-N 对流感病毒抑制作用的探讨.....	44
-----------------------------	----

4 重组 CV-N 作为生物药品的进一步研究及应用前景.....	45
----------------------------------	----

参 考 文 献 .....	46
---------------	----

## 第二部分 HIV-1 中和表位肽的克隆表达及其抗体的制备

前 言 .....	50
-----------	----

1 艾滋病病毒的概况.....	50
-----------------	----

2 HIV 病毒与靶细胞融合的分子机制.....	52
--------------------------	----

3 抗 HIV-1 中和抗体的研究进展.....	54
--------------------------	----

4 本研究目的与意义.....	62
-----------------	----

材 料 和 方 法 .....	63
-----------------	----

1 材料.....	63
2 方法.....	64
<b>结果和分析</b> .....	67
1 含目的基因原核表达载体的构建.....	71
2 目的蛋白的诱导表达.....	72
3 目的蛋白的纯化.....	73
4 鼠抗多克隆抗体的制备鉴定.....	73
5 多克隆抗体与 gp41 的相互作用.....	75
<b>讨论</b> .....	76
1 HIV-1 中和表位肽的选择.....	76
2 HIV-1 中和表位肽免疫原性的分析.....	77
3 HIV-1 中和表位肽表达量的分析.....	78
4 对后期中和病毒活性的实验设想.....	78
5 中和表位疫苗的可行性及其应用前景.....	78
<b>参考文献</b> .....	79
<b>致谢</b> .....	84

## 摘 要

艾滋病病毒进入 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞首先是通过病毒与细胞膜的融合来完成的,该过程涉及到病毒表面包膜糖蛋白(gp120 和 gp41)与细胞表面受体蛋白(CD4 和 CCR5 等)之间的相互作用。根据对这些蛋白质结构和作用机理的认识,本文从阻断病毒与宿主细胞的融合入手,设计新型的抗艾滋病药物及疫苗。研究工作主要包括:第一部分抗病毒蓝藻蛋白-N 的克隆表达及其生物活性的初步研究;第二部分针对 gp41 多表位-表位中和肽的克隆表达及其抗体的制备。

第一部分抗病毒蓝藻蛋白-N 的表达及其生物活性的初步研究。

Cyanovirin-N(CV-N)是美国科学家 Boyd 等于 1997 年在椭圆念珠藻(*Nostoc elliposporum*)中发现的一种大小为 11KD 的天然抗病毒多肽。研究表明, CV-N 对 HIV, SIV, Ebola 等多种包膜病毒具有显著的抑制作用。CV-N 能与病毒包膜糖蛋白特异性结合,从而阻断病毒与宿主细胞的融合,抑制阻断病毒的感染, CV-N 的这一功能使之有望成为一种广谱的抗病毒药物。

根据本实验室已构建的 pMD-CVN 为模板,设计引物,利用 PCR 技术扩增出 CV-N 基因,将成熟 CV-N 的编码框序列构建到原核表达载体 pET-His 中,在氨苄青霉素平板上筛选抗性转化子,并经 PCR、双酶切鉴定,挑选出阳性克隆子进行扩增, DNA 测序正确,表明成功地构建了原核表达重组载体 pET-CVN。将重组载体 pET-CVN 转化宿主菌 BL21(DE3),异丙基-β-D-半乳糖(IPTG)诱导表达目的蛋白。SDS-PAGE 分析鉴定目的蛋白,分析发现与预期外源目的基因表达产物相当的 12.7KD 左右处有特异蛋白条带,且目的蛋白是以包涵体的形式表达,凝胶成像仪分析其表达量高达 42.0%。采用透析法重折叠进行复性,亲和层析分离纯化此带有组氨酸标签重组的 CV-N 融合蛋白。用亲和层析分离纯化后的 CV-N 融合蛋白作为抗原,与弗氏佐剂完全乳化,采用皮下多点注射免疫的方法免疫昆明种小鼠,经过 31 天的免疫,获得鼠抗 CV-N 的多克隆抗体。采用间接酶联免疫吸附(ELISA)方法,测得抗体效价超过 1:8000,蛋白印迹(Western blot)分析结果显示,该抗体能特异性地与 CV-N 抗原产生明显免疫亲和反应。通过 ELISA 及免疫印迹实验证实,重组 CV-N 与 gp120 有很强的亲和能力;在体外重组 CV-N 对流感病毒的抑制实验表明,重组 CV-N 能抑制流感病毒生长繁

殖；采用直接标记法对重组 CV-N 进行异硫氰酸荧光素（FITC）的标记；FITC 标记的重组 CV-N 能与淋巴细胞相互作用，并且与不同种类的淋巴细胞的亲和能力不同，提示淋巴细胞表面有 CV-N 的靶蛋白。

本研究采用 pET 原核表达系统克隆表达 CV-N，制备了鼠抗 CV-N 多克隆抗体，用 FITC 标记重组 CV-N，初步探索重组 CV-N 的抗病毒生物活性。建立原核高效稳定表达 CV-N 系统，获得具有生物学活性的 CV-N 蛋白，所制备的抗体具有很强的灵敏性和特异性，为进一步研究开发 CV-N 作为抗病毒的生物药品奠定了基础。

第二部分针对 gp41 多表位-表位中和肽的克隆表达及其抗体的制备。

自从 20 世纪 80 年代中期 AIDS 已发展成为一种全球性的流行病以来，尽管人们对预防和治疗 AIDS 疫苗的研究进行了不懈努力，但至今还没有一种疫苗能获得理想的效果。最新研究进展表明，人源单克隆中和抗体研究取得瞩目的突破性进展，为中和抗体机制的艾滋病疫苗发展提供了合理基础。

在前人对 HIV-1 中和表位肽研究分析的基础上，设计引物，利用 PCR 技术扩增得到目的表位肽段 2F54E10 (NEQELLELDKWASLWN-NWFDIT) 的核苷酸序列，利用基因工程技术进行串联表达。经多步克隆，将目的基因多中和表位-表位 2F54E10 进行自连，获得目的基因的四串联体，并将四串联体克隆到原核表达质粒 pET-His 中，在氨苄青霉素平板上筛选抗性转化子，并经 PCR、双酶切鉴定，挑选出阳性克隆进行扩增，DNA 测序正确，表明成功地构建了原核表达重组质粒 pET-(2F54E10)<sub>4</sub>。重组质粒 pET-(2F54E10)<sub>4</sub> 转入 Gold code 表达宿主菌中，IPTG 诱导表达，SDS-PAGE 鉴定目的蛋白，凝胶电泳分析发现在预期外源目的基因表达产物的理论 Mr 值 12.0KD 左右处有特异蛋白条带，而质粒 pET-His 诱导表达后无此特异的蛋白条带，且目的蛋白是以包涵体的形式表达，采用切胶回收纯化法分离纯化目的蛋白，用分离纯化后的 2F54E10 融合蛋白作为抗原，与弗氏佐剂完全乳化，采用腹腔注射免疫的方法免疫小鼠，经过 41 天的免疫，获得制备鼠抗 2F54E10 的多克隆抗体，采用 ELISA 检测抗体的效价为 1:12800，免疫印迹实验结果表明制备的抗体特异性强，并能识别天然病毒包膜糖蛋白 gp41，说明制备的多克隆抗体具有潜在的中和病毒能力。

本研究实现了在原核表达 pET 系统中，利用基因工程技术进行串联表达目的

片段 HIV-1 中和表位肽 2F54E10 ,并把串联表达的中和表位肽免疫小鼠 ,获得鼠抗 2F54E10 的多克隆抗体。初步探索利用基因工程技术-小肽自连研究 HIV-1 多表位疫苗的可行性 ,为进一步研究开发以中和抗体为基础的 HIV-1 疫苗或药物奠定了坚实的基础。

**关键词：**Cyanovirin-N ; 2F54E10 ; 克隆表达 ; HIV-1 中和抗体 ; 抗 HIV-1 病毒



## HIV-1 epitope peptide and Cyanovirin-N Express and bioactivity of Cyanovirin-N primary study

### Abstract

The entry of HIV into host cells is mainly mediated by the fusion of the viral and cellular membranes, which involves the interactions of a series of biomacromolecules, such as gp120 and gp41, CD4 and CCR5. The deep understanding of the crystal structures, the surfactant details of their interaction, and the change of conformation during interaction of the macromolecules provides a new idea for the anti HIV drugs. This research consists of two parts. The first part is Cyanovirin-N Expression in *E.coli* and primary study of its bioactivity; the second part is Expression of HIV-1 Neutralizing Epitope Peptides.

In the first part, Cyanovirin-N (CV-N) originally isolated (Boyd MR et al.) from an aqueous extract of the cyanobacterium, *Nostoc elliposporum*, is 11 KD natural polypeptide with potent human immunodeficiency virus (HIV)-inactivity. It has been proved to suppress a broad range of respiratory and enteric viruses. Cyanovirin-N can specifically combine with the membrane of the virus particles so as to prevent virus binding to antigen of the host cells. The unique character of Cyanovirin-N makes it a potential new lead for the design of drugs against AIDS.

The nucleotide sequence of Cyanovirin-N was obtained by PCR. The expression plasmid pET-CVN was constructed by inserting the sequence of coding region of CV-N into pET-His vector which contained T7 promoter. Recombinant expression plasmid pET-CVN was verified by restriction endonuclease analysis and PCR and sequencing, and then was transformed into *E.coli* BL21 (DE3). Expression of CV-N was induced by IPTG at 30 °C for 8 hours. The expressed fusion protein was analyzed by SDS-PAGE, and the results indicated that 12.7KD protein expressed particularly in transformants. Also the Cyanovirin-N was expressed in the form of insoluble inclusion body, and the expression amount of Cyanovirin-N is about 42.00% of total proteins. Cyanovirin-N was refolded by using dialysis method. The target protein was isolated and purified through Ni-NTA Agarose Fast Flow. The highly purified

Cyanovirin-N was immune antigen. Rats were immunized and the polyclonal antibody to Cyanovirin-N was obtained. The titer of antibody was more than 1:8000 by ELISA detection. Western blot analysis showed that the antibody can bind with Cyanovirin-N specifically. The prepared antibody against Cyanovirin-N has good specificity and reactivity and can be used to detect the expression products of transgenic which expressed Cyanovirin-N gene. Cyanovirin-N was tagged with FITC. The recombinant Cyanovirin-N can specifically bind to gp120 on the membrane of the HIV particles analyzed by ELISA and Western-blot. The results showed that the recombinant Cyanovirin-N had bioactivity. In vitro assays to determine the activity of CV-N against a variety of influenza virus produced results that could be strong effect on anti-influenza A/B virus.

In this research, Cyanovirin-N was successfully cloned and expressed in *E.coli*, and obtained polyclonal antibody against Cyanovirin-N and Cyanovirin-N-FITC which was tagged with FITC. Construction of pET-CVN, Cyanovirin-N (CV-N) expressed plasmid, provided an efficient method to develop a broad-spectrum, cheap and facile genetic mutant medicine against AIDS, and prepared specific polyclonal antibody, which laid the foundation for study of its function.

In the second part, Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is a serious and worldwide health problem. In the past, passing immunity and vaccine-induced neutralizing antibodies (nAbs) responses against HIV were disappointing. However, recent data have shown surprising successes of anti-HIV nAbs. Epitope recognized by the protective monoclonal antibodies are an important determinants for protection and provide a rational basis for AIDS vaccine development.

In this research, the nucleotide sequence of HIV-1 two neutralizing epitope peptide 2F54E10 (NEQELLELDKWASLWN-NWFDIT) was obtained by PCR. The tandem 2F5E410 gene of 4 repeats was concatenated by gene engineering method. The 4 repeats gene encoding 2F54E10 was cloned into pET-His vector, and then recombinant expression plasmid pET-(2F54E10)<sub>4</sub> required was verified by restriction endonuclease analysis and PCR and sequencing. The recombinant plasmid was

transformed into *E.coli* Gold code and induced at 37 °C with 0.5mM IPTG for 3 hours. The expressed fusion protein was analyzed by SDS-PAGE, and the result indicated 12.0KD protein expressed particularly in transformants that was coherent with the aimed protein HIV-1 neutralizing antibody 2F54E10. The target protein was isolated and purified by gel extraction purification. The highly purified target protein was used to immune mice to prepare polyclonal antibodies. The titer of antibodies to 2F54E10 was more than 1:12800 by ELISA detection. Western bolt analysis showed that the polyclonal antibodies could bind with natural gp41 specifically.

In this study, the HIV-1 two neutralizing epitope peptide 2F54E10 was successfully expressed in the *E.coli*. Gold code, and obtained polyclonal antibodies. It's the first time to use gene engineering method to concatenat tandem 2F5E410 gene of 4 repeats to express HIV-1 neutralizing epitope peptide. We hope that the strong neutralizing antibody provide a rational basis for the anti-HIV-1 vaccine development.

**KEY WORDS :** 2F54E10 ; HIV-1 neutralizing antibodies ; Expression  
Cyanovirin-N ; Anti-HIV

# 第一部分 抗病毒蓝藻蛋白-N的表达 及其生物活性探讨

## 前 言

### 1 抗病毒蓝藻蛋白-N的研究进展

美国科学家Boyd等<sup>[1]</sup>人于1997年报道,他们采用XTT[2,3-二-(2-甲氧基-4-硝基-5-亚硫酸基)-(二氢)-四唑-5-羧苯胺]染色法,从椭圆念珠藻(*Nostoc elliposporum*)的提取物中发现一种全新的具有抗HIV病毒活性的多肽类物质——Cyanovirin-N(CV-N)。研究表明CV-N具有多种抗病毒活性。除了对各种类型实验株及初分离的HIV病毒外,还发现CV-N对埃博拉病毒(Ebola virus)和流感病毒等多种包膜病毒具有明显的抑制作用。CV-N是一种广谱抗病毒多肽,这可能是由于CV-N的靶位是由甘露糖的寡糖链构成的,因而它也可以识别其他病毒被膜表面类似的寡糖结构<sup>[2]</sup>。

#### 1.2 CV-N的分子结构

##### 1.2.1 CV-N的一级结构

用Edman降解法和电喷雾电离质谱(ESI-MS)对经HPLC纯化的CV-N的序列和结构进行了测定。现已获得CV-N一级结构的详细信息(图A-1),它是由101个氨基酸残基构成的多肽链<sup>[1]</sup>。

Gustafson和Sowder等人<sup>[3]</sup>在分析CV-N的氨基酸序列后发现,在1~50残基和51~101残基间存在着高度保守的13个氨基酸残基,以及16个具有直接同源性的残基。利用快速原子轰击质谱(FAB-MS)证实CV-N成熟蛋白中存在2个链内的二硫键,分别位于8和22位,58和73位的半胱氨酸残基之间,如图A-2。现已证明,这些二硫键的断裂将导致CV-N活性的丧失。

```

5' CTT GGT AAA TTC TCC CAG ACC TGC TAC AAC
3' GAA CCA TTT AAG AGG GTC TGG ACG ATG TTG
TCC GCT ATC CAG GGT TCC GTT CTG ACC TCC
AGG CGA TAG GTC CCA AGG CAA GAC TGG AGG
ACC TGC GAA CGT ACC AAC GGT GGT TAC AAC
TGG ACG CTT GCA TGG TTG CCA CCA ATG TTG
ACC TCC TCC ATC GAC CTG AAC TCC GTT ATC
TGG AGG AGG TAG CTG GAC TTG AGG CAA TAG
GAA AAC GTT GAC GGT TCC CTG AAA TGG CAG
CTT TTG CAA CTG CCA AGG GAC TTT ACC GTC
CCG TCC AAC TTC ATC GAA ACC TGC CGT AAC

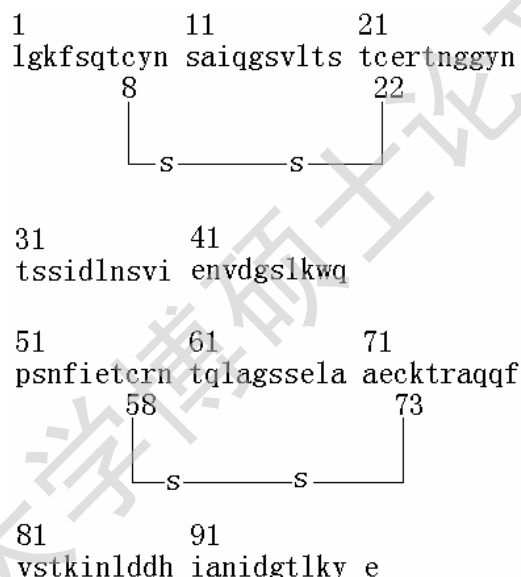
```

```

GGC AGG TTG AAG TAG CTT TGG ACG GCA TTG
ACC CAG CTG GCT GGT TCC TCC GAA CTG GCT
TGG GTC GAC CGA CCA AGG AGG CTT GAC CGA
GCT GAA TGC AAA ACC CGT GCT CAG CAG TTC
CGA CTT ACG TTT TGG GCA CGA GTC GTC AAG
GTT TCC ACC AAA ATC AAC CTG GAC GAC CAC
CAA AGG TGG TTT TAG TTG GAC CTG CTG GTG
ATC GCT AAC ATC GAC GGT ACC CTG AAA TAC
TAG CGA TTG TAG CTG CCT TGG GAC TTT ATG
GAA 3'
CTT 5'
    
```

图A-1 CV-N的一级结构

Fig.A-1 Primary DNA sequence of CV-N



图A-2 位于CV-N链内的2个二硫键示意图

Fig.A-2 The disulfide cross link in the amino acid sequence

### 1.2.2 CV-N的高级结构

Bewley<sup>[4]</sup>等人利用高分辨率核磁共振技术研究了溶解状态的CV-N的结构。CV-N主要由  $\beta$ -折叠片结构形成的链状蛋白，折叠后的构象呈现半对称（见图A-3）。整个多肽链由2个序列重复单元组成，两者之间氨基酸残基水平的相似性高达32%，但是这2个重复单元并不形成独立的2个结构域。

Yang<sup>[5]</sup>等人用分辨率达1.5Å的X射线衍射技术研究了CV-N的晶体结构，发现CV-N结晶属于P3221空间构型，每个不对称单元内含有1个CV-N单体，每个单体由结构和序列上高度相似的2个结构域即结构域I，II组成，在晶体衍射图中可以见到2个对称分布单体通过结构域转换(domain swapping)形成二聚体结构（见图

A-4)。这一结论与NMR获得的结果是完全吻合的。尽管在实验中使用了由100%单体构成的CV-N样品，但在晶体衍射的结果中只能找到由二聚体形成的CV-N晶体。在X-射线衍射中，主链原子的平均方差衍射仅为0.55 Å。

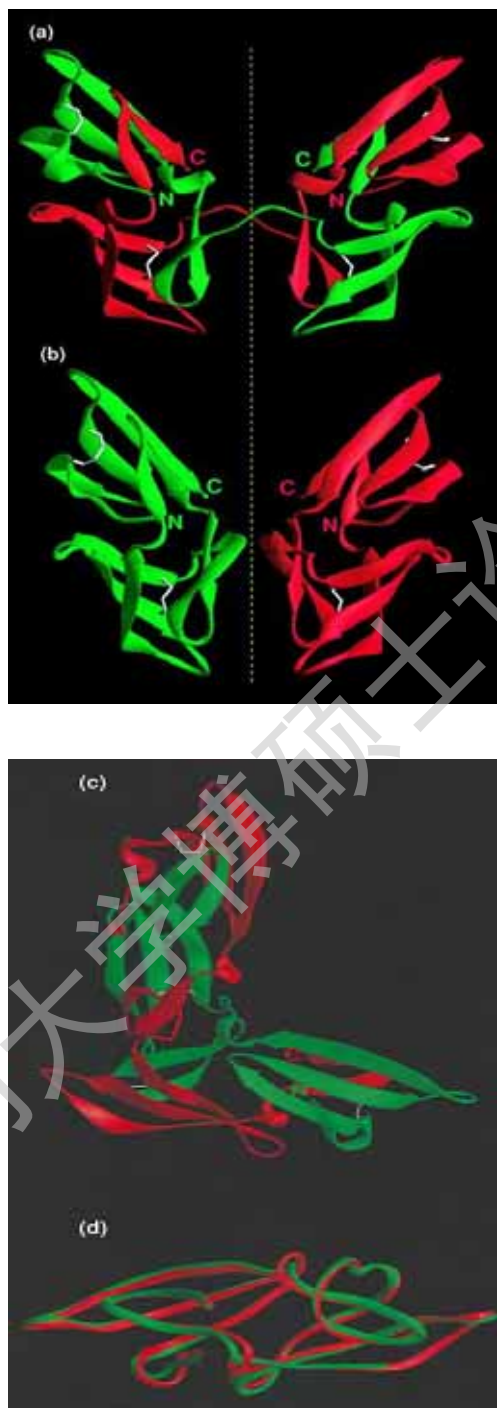
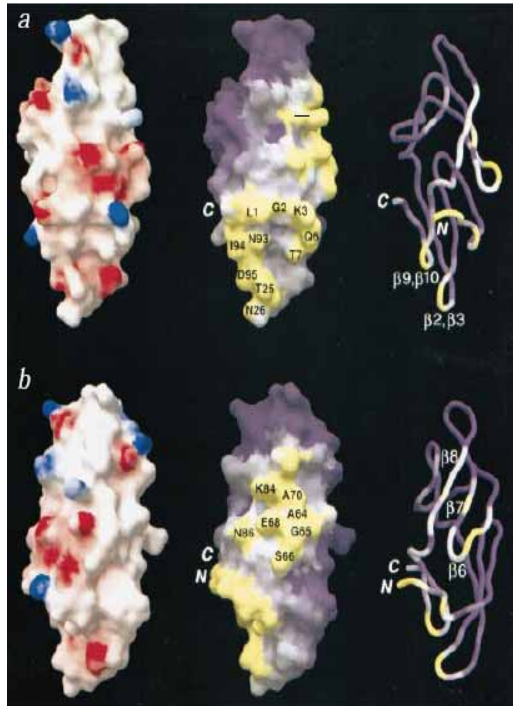


图 A-3 CV-N晶体空间结构示意图

Fig. A-3 The crystal structure of CV-N

- a：通过结构域交换形成的二聚体 b：CV-N 核磁共振结构图  
c：通过结构域交换形成的二聚体侧面图 d：单体晶体结构图



图A-4 溶液状态的CV-N结构示意图

Fig.A-4 The solution structure of CV-N

a : 正面    b : 侧面    标记为疏水基团分布区域

### 1.2.3 CV-N的突变体

到目前为止,关于CV-N抗HIV病毒的特异序列及与gp120的结合位点尚不清楚。Mori<sup>[6]</sup>等人探讨了CV-N维持抗病毒活性的必需基团,分析确立了抗病毒活性的结构域,但是未阐述与gp120的结合位点。

关于 CV-N 的天然结构、基因工程突变体及其它结构的抗 HIV 病毒活性以及与 gp120 特异性结合均进行了研究,早期的研究确立了 CV-N 抗病毒活性的结构域<sup>[7]</sup>。CV-N 与 gp120 结合是抗 HIV 的必需条件但并非是充分条件。铰链区域的突变体会影响两个结构域的动力学,阻断 3D 结构域的转换或者阻断蛋白构象的延伸。有些突变体能改变对口袋 (pocket) 的结合,能阻断糖与 CV-N 的结合;但有些突变体不会影响 CV-N 与 gp120 的结合。CV-N 铰链区的突变体[S52P]CV-N 以稳定的二聚体形式存在溶液中,与天然 CV-N 相比,其抗病毒活性大大降低<sup>[8]</sup>。

基因工程突变体[P51G]CV-N 以单体、二聚体形式存在溶液中,在实验室条件下比天然的 CV-N 更稳定<sup>[9]</sup>。[P52G]CV-N 突变体第 30 位天冬酰胺残基突变为 A/Q/V 而形成的突变体,抗病毒活性与天然 CV-N 相比基本相同<sup>[10,11]</sup>。基因工程双突变体[P51S/S52P]CV-N 的生物物理特性与天然 CV-N 的基本没有差别<sup>[12]</sup>。删除铰链区的第 50 位氨基酸残基 Gln50 的 CV-N 突变体,阻断 HIV-1 病毒与细胞融合比天然 CV-N 的单体更强<sup>[13]</sup>。与 gp120 结合的第二个结合位点完全被删除(三个氨基酸残基 (K3N, E23I, N93A) 和四个氨基酸残基 (K3N, T7A, E23I,

N93A)) 的 CV-N 突变体, 与 Man 1 2Man 结合能力与天然 CV-N 的相当, 抑制 HIV 病毒活性与天然 CV-N 的基本相同<sup>[14]</sup>。内部序列交换的 CV-N 突变体 (dsCV-N), 功能域 A、B 的核心部位进行交换而前三与最后三个氨基酸残基没有交换, 抑制 HIV 病毒融合作用远远低于天然 CV-N 的<sup>[15]</sup>。环绕排序 (circularly-permuted) 的 CV-N 突变体 (cpCV-N), 其稳定性、抗病毒活性均低于天然 CV-N 的<sup>[16, 17, 18]</sup>。Laura<sup>[19]</sup> 等人研究 CV-N 单体与二聚体的互变, 结果表明 CV-N 抗病毒活性基本不会受到影响。2003 年 Botos<sup>[10]</sup> 等人对 CV-N 及其突变体的生物活性进行统计, 见表 A-1。

表 A-1 CV-N 及其突变体的生物活性

Table.A-1 Summary of biological activity of CV-N and its mutants

Protein	Order of residues	EC <sub>50</sub> (nM)	Referen index
Wide-typeCVN	1-101	0.9 ± 0.4	33
CVN-1	2-101	2.0 ± 0.7	33
CVN-2	3-101	8.3 ± 4.0	33
CVN-3	4-101	140.7 ± 36.7	33
F-CVN	1-101	3.6 ± 1.4	33
F-CVN	1-98	149.5 ± 17.2	33
F-CVN	1-93	inactive	33
F-D1D1	1-50, 1-50	inactive	33
F-D2D2	52-101, 51-101	inactive	33
F-D2D1	52-101, 1-50	217.7 ± 9.5	33
F-C8S-C22S	1-101	inactive	33
F-C58S-C73S	1-101	inactive	33
		EC <sub>50</sub> (nM)	
Wide-typeCV-N	1-101	0.19	34
A77T	1-101	0.22	34
S52P	1-101	1.46	34
cpCVN	1-3, 54-98, 48-53, 4-47, 99-101	1000 × less potent than wt	39
dsCVN	1-3, 54-98, 48-53, 4-47, 99-101	500 × less potent than wt	38

F: F indicates uncleaved FLAG-tag used in protein expression

### 1.3 Cyanovirin-N 抗病毒活性的作用机制

虽然到目前为止Cyanovirin-N抗病毒活性机制还没有完全阐明, 但有足够研究表明, CV-N的抗病毒活性主要是影响病毒包膜上的糖蛋白与病毒靶细胞表面受体的结合, 从而干扰病毒的正常侵入以及传播途径。2004年Zhaozhong H<sup>[20]</sup> 等人利用构建M13噬菌体肽库, 筛选出与CV-N相互作用的多肽TN10-1, 进一步研究与CV-N结合多肽的特性, 发现TN10-1多肽相似于糖蛋白 gp120上的蛋白部分而不是寡聚糖部分。Cyanovirin-N的抗HIV活性主要表现在下列几个方面: 使T



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库